



**An die Teilnehmer
der INSTAND e.V. -Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 541)**

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 20-26 of this document. As always, result tables are depicted in a bilingual style.

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

Sie erhalten hiermit die Auswertung des aktuellen INSTAND-Ringversuchs zum Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken.

Ihre individuellen Resultate und deren Bewertung können Sie in gewohnter Weise der beigefügten Teilnahmebescheinigung entnehmen.

Falls Sie an einer etwas umfangreicheren Diskussion unserer Ringversuchsaktivitäten im Bereich "Bakteriengenom-Nachweis" und näheren Informationen zur Konzeption der Ringversuchsproben interessiert sein sollten, sei hier wie gehabt auf folgende Veröffentlichungen in den Zeitschriften "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: BÄMI, Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.) und "Hygiene und Mikrobiologie" (Herausgeber: DGHM, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.) verwiesen:

> Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2003) "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT": Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologe* **13**:149-156.

> Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2004) *Hyg. Mikrobiol.* **8**:19-21.

Sowohl im Zusammenhang mit einer Erweiterung unseres Ringversuchsprogramms als auch bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Erfreulicherweise waren die Kommentare in den letzten sieben Jahren überwiegend positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

June 8, 2010

To the participants of the
INSTAND external quality assessment scheme (EQAS)
for NAATs in Diagnostic Bacteriology
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 541)

Dear Participant, dear Colleague,

Please find enclosed a brief analysis report of the recent proficiency test panel "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)". It summarizes some benchmarks and the overall assessment of results reported by all of the the participating laboratories.

The accuracy of your individual results is indicated on your personal certificate issued by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany (attached to this letter).

This highly desired sheme for external quality assessment (EQAS) was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. As you can learn from "www.instandev.de", this new segment of their huge proficiency testing program is now open for diagnostic laboratories worldwide. We are aiming at two validation rounds per year (spring and autumn), a reasonable price of less than € 150 per set, and a permanently expanding coverage of relevant bacterial pathogens. Any general or specific comments on sample composition or suggestions on additional bacterial, fungal, or parasitic organisms which should be covered, are highly appreciated.

Please do not feel irritated by some strong-positive samples among the present set. To make participants and ourselves familiar with the concept and the suitability of the proprietary sample matrix, "passing" should be easy in the initial rounds. But now as the program continues, it is our challenge (and duty) to rise at least some of the hurdles with every round of external validation.

Further information as well as the documented and analyzed results of the past rounds of our quality control and proficiency test program "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT) can be downloaded in form of pdf-files at "www.udo-reischl.de", subsection "INSTAND Ringversuche (PCR / NAT)". Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least some key documents and the tables in a bilingual style. **New since 2009:** due to the growing number of international participants, we will further include a brief discussion of the results in English (see the following pages).

Hopefully you found this kind of external validation benefitting and you will continue to join the future rounds of our EQAS scheme in bacterial genome detection (NAT/ PCR).

If you should have any further questions, please do not hesitate to contact me by e-mail: "udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de"

With best personal regards,



PD Dr. Udo Reischl

Organizer of the proficiency testing program "Bacterial Genome Detection"
Member of the Quality Assurance Board (DGHM; German Society of Hygiene and Microbiology)

Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 11 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder zwei „highlights“: zum einen wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 531 wieder die **schwedische Chlamydienvariante (nvCT)** ausgesandt und zum anderen befand sich der **sog. Züricher Drogenstamm** in einer der 4 Proben des MRSA Ringversuchs RV 539.

Eine weitere Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir beschäftigen uns gerade mit der Konfektionierung und Herstellung eines Proberingversuchs für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis*. Eine limitierte Anzahl von entsprechenden Probensets wird voraussichtlich im Rahmen der kommenden Ringversuchsrunde im November 2010 für interessierte Teilnehmer verfügbar sein. Als Sollwertlabor fungieren hier die Kollegen Dr. D. Frangoulidis und Dr. W. Splettstösser vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen.

Übrigens: das **REMMDI 2011** wird vom **14.-16. April 2011** wieder in Regensburg stattfinden. Diesen Termin eventuell schon mal vormerken... Nähere Informationen finden Sie demnächst unter www.remmdi.de

APRIL 2010:

Entsprechend des Grundgedankens unserer Ringversuchsaktivitäten wurde auch bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum "Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)" bei einigen Zielorganismen der Versand von Proben mit relativ niedrigen Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 1015303, 1015304, sowie die schwach positive Probe des RV 531 # 1015314), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1015303), *Bordetella pertussis* (Probe # 1015324), *Helicobacter pylori* (Probe # 1015334), *Borrelia afzelii* (Probe # 1015352), *Legionella pneumophila* (Probe # 1015363), sowie *Listeria monocytogenes* (Probe # 1015381). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 1015313 dieser Ringversuchsrunde. Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten "grenzwertig positiven" Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von "durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten" eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

Bei den meisten Probenmaterialien der aktuellen Ringversuchsrunde stellen falsch-negative Ergebnisse damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar. Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung und/oder auf mangelnde Spezifität der eingesetzten Testsysteme zu betrachten.

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Tabelle 1 zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tabelle 2 nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen und in Tabelle 3 nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum "Gelegenheitsanwender" abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden. Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerzieller PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Wie in der Einführung bereits kurz erwähnt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal wieder eine Probe mit der zumindest in Fachkreisen (und auch aus dem Ringversuch Mai 2009) bereits hinlänglich bekannten schwedischen *C. trachomatis* Mutante nvCT. Um bei der Auswertung dieses Ringversuchs möglichen falsch-negativen Ergebnissen durch mangelnde analytische Sensitivität der eingesetzten PCR-gestützten Testsysteme entgegenzutreten, befand sich dieses spezielle Isolat in relativ hoher Menge von $\sim 10^5$ IFU/ml in Probe # 1015313. Darüberhinaus enthielt das aktuelle Ringversuchssset eine Probe mit einer etwa 100-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 1015314 mit 10^3 IFU/mL an *C. trachomatis*), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1015311 und # 1015312), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielt.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei der positiven Probe # 1015314 mit geringen Mengen eines *C. trachomatis* Wildtyp-Isolats lediglich von 3 der insgesamt 125 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Dies bestätigt erneut die gute analytische Sensitivität der mittlerweile bestens etablierten (größtenteils kommerziellen) NAT-gestützten Testsysteme, die im Teilnehmerkreis Verwendung finden.

Bei Probe # 1015313, die eine relativ hohe Menge der *C. trachomatis* Mutante aus Schweden enthielt, wurden jedoch „erwartungsgemäß“ bei einigen Teilnehmern mit nicht entsprechend adaptierten Testkonzepten falsch-negative Befunde erhalten. Bei genauerer Betrachtung der verwendeten Testsysteme ist das nicht allzusehr verwunderlich, denn innerhalb der Riege kommerzieller Testsysteme ist lediglich die ursprüngliche Version des COBAS Amplicor CT Test nicht in der Lage, die schwedische *C. trachomatis* Mutante zu detektieren. Seitens Roche Diagnostics wurde dieser Test zwar relativ rasch nach dem ersten Auftreten des schwedischen nvCT Isolats durch das COBAS TaqMan CT v2.0 Testsystem ersetzt, aber es befinden sich offensichtlich bei einigen Teilnehmern noch Testsysteme der älteren Generation in Anwendung. Dieser Umstand ist sehr gut in der testspezifischen Darstellung der Ergebnislage in Tabelle 3 zu erkennen: hier wurde noch von 10 Teilnehmern die Verwendung des COBAS Amplicor CT Tests angegeben (im Mai 2009 waren es 15 Teilnehmer) und dabei die Probe # 1015313 durchgehend als falsch-negativ befundet. Demgegenüber haben im aktuellen Ringversuch 33 Teilnehmer den COBAS TaqMan CT Test verwendet und damit auch die Probe # 1015313 durchgehend als positiv befundet. Vergleichbares gilt auch für die ursprüngliche Version des Abbott m2000rt CT/NG Testsystems, dessen aktuelle Version im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs nun ebenfalls eine Richtigkeitsquote von 100 % für alle 4 Proben erreichen konnte.

Die im Zusammenhang mit der erstmaligen Aussendung der schwedischen *C. trachomatis* Mutante nvCT bei unserem Ringversuch RV 531 vom Mai 2009 beobachtete Ergebnislage ist übrigens in Eurosurveillance (www.eurosurveillance.org) veröffentlicht: Reischl, U., E. Straube, and M. Unemo (2009) The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organized by INSTAND e.V., Germany. Euro Surveill. 2009;14(32):pii=19302

Aufgrund des (zumindest im deutschsprachigen Raum) in klinischem Probenmaterial nur sporadisch zu erwartenden Auftretens dieser Chlamydienvariante wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis bei der Probe # 1015313 nicht als "falsch-negativ" bewertet. Die 12 Ringversuchsteilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für diese Probe sollten aber die verwendeten Zielsequenzen sowie die Hybridisierungsregionen der verwendeten Primer und/oder Sonden ihrer Testsysteme gegebenenfalls nachbessern oder ihre Chlamydiendiagnostik auf aktuelle Versionen kommerzieller Testsysteme umstellen, um von der 377-bp Deletion im kryptischen Plasmid nicht mehr beeinträchtigt zu werden. Unabhängig vom Auftreten der nvCT Variante in der einheimischen Bevölkerung erscheint eine möglichst umgehende Adaption der eingesetzten NAT-gestützten Testsysteme angeraten.

Die beiden negativen Proben # 1015311 und # 1015312 wurden diesmal von nahezu allen Teilnehmern als richtig negativ befundet und unter den insgesamt 250 mitgeteilten Ergebnissen für

diese beiden Proben befand sich lediglich ein falsch-positives Ergebnis. Zudem wurden im aktuellen Ringversuch durchgehend interpretierbare Befunde erhalten und keine als "fraglich" klassifizierten Ergebnisse berichtet.

Der durch die Mitführung der nvCT Variante bedingte Effekt in den Richtigkeitsquoten bestimmter kommerzieller und eigenentwickelter Testsysteme wird in der zusätzlich angefertigten Tabelle 4 deutlich. Hier sind nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse ohne Berücksichtigung der Probe #1015313 dargestellt und statistisch ausgewertet.

Wie auch bereits in früheren Ringversuchsrunden beobachtet, scheint mit 10^3 IFU/ml an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme noch nicht ganz erreicht zu sein. Ringversuchsteilnehmer mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität sollten falsch-negative Ergebnisse bei der Probe # 1015314 daher zum Anlaß einer Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems nehmen. Angesichts der nach wie vor aktuellen Diskussion um das "poolen" von Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme auch weiterhin hoch relevant.

Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden in der aktuellen Ringversuchsrunde nicht beobachtet.

Bis auf die diagnostische Erfassung der schwedischen *C. trachomatis* Variante waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen zu beobachten. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (3x), HAIN GenoQuick CT (1x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (1x), und Minerva Biolabs Onar CT (1x).

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen hinsichtlich der Erfassung der neuen schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) interessiert sind, stehen mit dem aktuellen Ringversuch standardisierte Rückstellproben mit definierter Menge an Zielorganismen zur Verfügung, die direkt über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind

ENGLISCH:

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *C. trachomatis* target organisms (# 1015313, $\sim 10^5$ IFU/ml and # 1015314, $\sim 10^3$ IFU/ml), and two samples without target organisms (# 1015311 and # 1015312; containing only non-infected human cells and *Escherichia coli*). Interestingly, one of the CT-positive samples of the current set (# 1015313) contained $\sim 10^5$ IFU/ml of the **new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT)**, discovered in Sweden in 2006. Meanwhile it is well known that this strain is distinguished by a 377 bp deletion in the cryptic plasmid, which includes the targets for the former versions of the Roche COBAS Amplicor CT/NG and Abbott m2000rt CT/NG tests. An almost identical sample with the nvCT strain was included in one of our previous ring trials (May 2009). A detailed discussion of the results observed in the course of this former INSTAND ring trial was published in the open access journal Eurosurveillance (www.eurosurveillance.org): Reischl, U., E. Straube, and M. Unemo (2009) The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis* (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organized by INSTAND e.V., Germany. Euro Surveill. 2009;14(32):pii=19302

As depicted in table 2, only one false-positive result and only three false-negative results were reported for the other three samples of the current set. Sample # 1015313, which contained significant amounts of the new CT variant, was definitely missed by participants using the former versions of the ROCHE COBAS Amplicor CT/NG. Obviously some (but not all) of the laboratories which missed the nvCT strain in May 2009 have improved their in-house NAT assays or switched to current versions of the commercial test systems in the meantime. As expected, participants using the current versions of these test systems observed positive CT results for this particular sample # 1015313. Aside from the nvCT issue, a very good diagnostic performance was observed for the *C. trachomatis*-specific PCR assays used by the 125 participants.

PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis*
(RV 531) April 2010



Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.
Sample composition and expected results.

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
1015311	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1015312	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1015313	+++	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> nvCT (~ 1x10 ⁵ IFU/mL)
1015314	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)

Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.
Absolute numbers of reported individual results.

n = 125	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1015311	1015312	1015313	1015314		1015311	1015312	1015313	1015314
Befund <i>Result</i>									
Positiv	0	1	113	122	n.d.	1	1	1	1
Negativ	125	124	12	3	nein <i>no</i>	124	124	124	124
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.

Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.

NAT-Methode [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 20)	39	39 / 40	98	40	40 / 40	100
LightMix CT [21] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 33)	66	66 / 66	100	66	66 / 66	100
COBAS Amplicor [23] (n = 10)	20	10 / 20	50	20	20 / 20	100
BD ProbeTec [24] (n = 23)	46	46 / 46	100	46	46 / 46	100
Artus CT [25] (n = 12)	24	24 / 24	100	24	24 / 24	100
Abbott CT/NG [26] (n = 6)	12	12 / 12	100	12	12 / 12	100
Other commercial tests [27] (n = 10)	18	18 / 20	90	19	19 / 20	95
In house PCR assay [28] (n = 9)	17	17 / 18	94	18	18 / 18	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	2	2 / 4	50	4	4 / 4	100

* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.

Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants

Tabelle 4: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden ohne Berücksichtigung der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe 1015313.

Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods (without considering nvCT sample 1015313).

NAT-Methode [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 20)	19	19 / 20	95	40	40 / 40	100
LightMix CT [21] (n = 1)	1	1 / 1	100	2	2 / 2	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 33)	33	33 / 33	100	66	66 / 66	100
COBAS AmpliCor [23] (n = 10)	10	10 / 10	100	20	20 / 20	100
BD ProbeTec [24] (n = 23)	23	23 / 23	100	46	46 / 46	100
Artus CT [25] (n = 12)	12	12 / 12	100	24	24 / 24	100
Abbott CT/NG [26] (n = 6)	6	6 / 6	100	12	12 / 12	100
Other commercial tests [27] (n = 10)	9	9 / 10	90	19	19 / 20	95
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 9)	8	8 / 9	89	18	18 / 18	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	2	2 / 2	100	4	4 / 4	100

* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.
Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2010

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

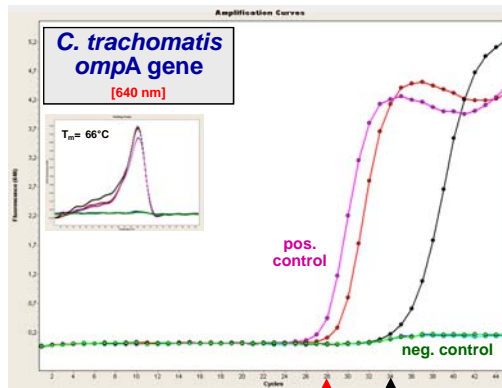
- 11 1015311 27,59
- 12 1015312 34,69
- 13 1015313 26,02
- 14 1015314 26,02
- 15 Pos. Ko. Chl. trachomatis 26,02
- 16 NTC



LightCycler PCR protocol:
 Proprietary *C. trachomatis*-specific
 LightCycler assay developed by
 TIB Molbiol, Berlin, Germany
 (<http://www.tib-molbiol.de>)

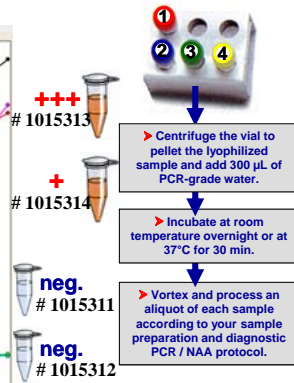


C. trachomatis:
 SET: 98



infected cells / PCR reaction:

~10³ ~10¹



IN STAND-A09_I/10



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis*

status 04.2010

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Straube

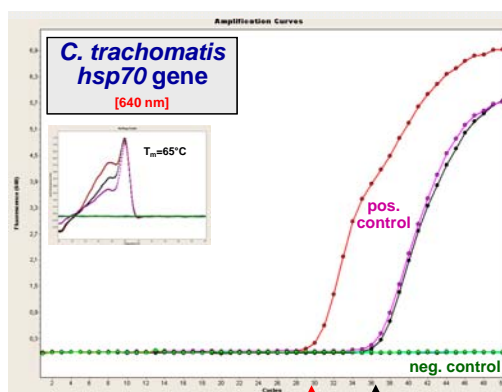
- 11 1015311 28,80
- 12 1015312 35,79
- 13 1015313 35,66
- 14 1015314 35,66
- 15 Pos. Ko. Chl. trachomatis 35,66
- 16 NTC



LightCycler PCR protocol:
 Wood, H., U. Reischl, and R. Peeling
 (2001) Rapid detection and quantification
 of *Chlamydia trachomatis* in clinical
 specimens by LightCycler PCR. In: Rapid
 Cycle Real-Time PCR: Methods and
 Applications (Reischl, U., Wittwer, C.,
 and Cockerill, F., eds.), ISBN 3-540-
 41881-4, Springer Press, Heidelberg, pp.
 115-132.

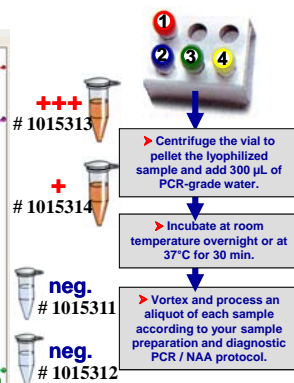


C. trachomatis:
 SET: 98



infected cells / PCR reaction:

~10³ ~10¹



IN STAND-A10_I/10

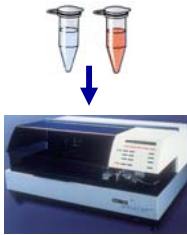


531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 04.2010

➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

ROCHE COBAS Amplicor *Chlamydia trachomatis*



1015311	CT	0.002	---	NEGATIVE
	NG	0.003	---	NEGATIVE
	CNC	3.979	---	POSITIVE
1015312	CT	0.002	---	NEGATIVE
	NG	0.002	---	NEGATIVE
	CNC	3.979	---	POSITIVE
1015313	CT	0.002	---	NEGATIVE
	NG	0.002	---	NEGATIVE
	CNC	3.678	---	POSITIVE
1015314	CT	3.677	---	POSITIVE
	NG	0.003	---	NEGATIVE
	CNC	3.502	---	POSITIVE

Cobas amplicor CT1



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

Regensburg



INSTAND-A11_I/10



531 Bakteriengenom-Nachweis *Chlamydia trachomatis* status 04.2010

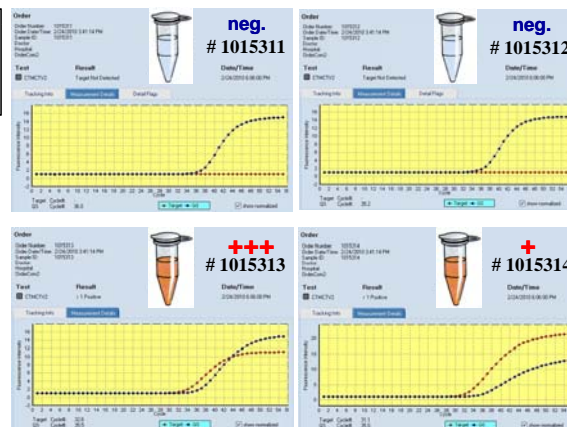
➤ Evaluation (qualitative PCR):

Reischl / Straube

ROCHE COBAS TaqMan *Chlamydia trachomatis*



COBAS® TaqMan® CT Test, v2.0



Cobas TaqMan_C-trachomatis



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

Regensburg



INSTAND-A12_I/10